UNIVERSITA' DI PISA
ISTITUTO DI PATOLOGIA VEGETALE E DI MICROBIOLOGIA AGRARIA E TECNICA
OSSERVATORIO REGIONALE DI FITOPATOLOGIA

432

O. VERONA e A. RAMBELLI

NOTIZIE, RICERCHE E CONSIDERAZIONI RELATIVE « CANDIDA PULCHERRIMA » ED ALTRI LIEVITI AD ANALOGA FISIONOMIA.

Estratto da « *Annali Facoltà di Agraria* » - Vol. XXII, 1961

Tipografia Editrice Comm. U. GIARDINI - Pisa 1961

COMMONWEALTH MYCOLOGICAL INSTITUTE
15 NOV 1962

O. VERONA e A. RAMBELLI (*)

NOTIZIE, RICERCHE E CONSIDERAZIONI RELATIVE « CANDIDA PULCHERRIMA » ED ALTRI LIEVITI AD ANALOGA FISIONOMIA.

Premessa

In precedenza uno di noi (RAMBELLI) studiando i lieviti presenti nei fiori di Eucalitto notò frequente una specie che, nonostante i molti punti di contatto sul piano fisiologico con *Candida pulcherrima*, fu dubitativamente e provvisoriamente riferita al gen. *Lipomyces*. Il riferimento, sia pure dubitativo, a *Lipomyces* fu suggerito dalla presenza abbondante di cellule contenenti una grossa goccia oleosa ([36]).

Lo stesso riferimento non ci esonerò, tuttavia, da un più esauriente confronto con *C. pulcherrima* e, in estensione, con *Candida Reukaufii* (Gröss) Diddens et Lodder — in ceppi da noi isolati da fiori di eucalitto — presentando anche questa specie (che tra l'altro è ospite caratteristica di nettari) analoga fisionomia biochimica ([47]).

Lo studio comparativo di tali specie e ceppi è quanto forma oggetto del presente lavoro.

Esso si articola come segue:

I - NOTIZIE SU CANDIDA PULCHERRIMA.

a - Breve storia della specie
b - Ecologia
c - Caratteri morfologici e colturali
d - L'ammessa sporulazione
e - Caratteri fisiologici

(*) Della Sezione di Microbiologia del Centro di Sperimentazione Agricola e Forestale dell'E.N.C.C. in Roma.

f - La produzione di pigmento
g - Fenomeni dissociativi
h - Ciclo di sviluppo e posizione sistematica
i - Altre notizie

II - RICERCHE COMPARATIVE TRA C. PULCHERRIMA ED ALTRI LIEVITI AD ANALOGA FISIONOMIA.

a - Provenienza dei ceppi
b - Caratteri colturali
c - Caratteri morfologici
d - Caratteri fisiologici

III CONSIDERAZIONI SISTEMATICHE

I - *NOTIZIE SU CANDIDA PULCHERRIMA*

BREVE STORIA DELLA SPECIE.

Una sintesi storica di questa specie già è stata data, con molta chiarezza, da LODDER e KREGER-VAN RIJ ([25]). Qui non possiamo che ripetere, sommarizzando, che quella descrizione.

C. pulcherrima, isolata da Lindner nel 1899 da prugne supermature, da uva e da escrementi di vermi delle mele, fu descritta dallo stesso nel 1901 ([21]) e quindi ancora nel 1930 ([22]).

SACCARDO, nel 1906, l'attribuiva al gen. *Torulopsis* ([39]). Seguirono gli studi di BEIJERINCK (1912, 1915-16, 1918) ([2], [3], [4]). Isolata da vario materiale — tubo digerente di Calabroni, miele, nettari fiorali, uva, polvere di ambienti di malteria — egli denominò la specie *Saccharomyces* (*Torula*) *pulcherrimus* Lindner ed osservò che essa era caratterizzata da due tipi di cellule: cellule rotonde, di μ 7 circa di diametro con grosso globulo oleoso e cellule di più piccola forma, un poco allungate, di μ 3x4. Chiamò questo secondo tipo di cellule *Saccharomyces pulcherrimus secundarius*. Tentativi per ottenere colture pure dell'uno o dell'altro tipo risultarono vani.

Osservò ancora, BEIJERINCK, che la specie può formare pigmento rossastro in presenza di aria e di tracce di sali di ferro (v. oltre).
PUNKARI e HENRICI (1933, 1935) ([35]) esaminarono la variabilità di *C. pulcherrima* e notarono che in funzione di tale variabilità si possono avere ceppi con vegetazioni lisce o rugose: in queste è presente un rudimentale pseudomicelio.

LODDER ([24]) descrive la specie, nel 1934, come *Torulopsis pulcherrima* e istituisce la varietà *variabilis* per dei ceppi che presentano cellule di varia forma e danno origine a pellicola in estratto di malto.

Seguono gli studi della PORCHET (1938) ([33]). Su dieci ceppi isolati da varie frutta osservò che quattro si dimostravano capaci di formare pseudomicelio e anche, su corti filamenti, una specie di conidi. Questi quattro ceppi potevano a lor volta essere distinti in due tipi: un tipo a colonie rosse e cellule lunghe formanti pseudomicelio e un tipo a colonie bianche e lisce formate da cellule rotonde con grossa goccia oleosa. Alla PORCHET non risultò necessaria, per la formazione di pigmento, la presenza di sali di ferro.

CASTELLI (1940) ([7]) nota la particolare frequenza di *C. pulcherrima* in mosto d'uva e, studiando i molti ceppi da lui isolati, segrega la var. *rubra* per dei ceppi formanti un intenso pigmento rosso. CASTELLI concorda con BEIJERINCK nel riconoscere la grande influenza del ferro nella formazione di pigmento.

Con WINDISCH (1940) ([50], [61]) viene affrontata la questione della possibile formazione di spore. WINDISCH non solo ne ammette la possibilità (v. avanti); ma notando la condizione binucleata delle cellule avvicina la specie al gen. *Taphrina* e istituisce addirittura, per essa, la nuova Famiglia delle *Candidaceae* entro gli *Exoascales*. Esamineremo più tardi tale questione insieme ai successivi lavori di ROBERTS ([38]). Diremo solo, per ora, che la formazione di spore da parte di *C. pulcherrima* è stata messa in dubbio da LANGERON e LUTERAAN (1947) ([20]) e più recentemente da VAN DER WALT (1952) ([41]).

Finalmente VERONA e FLORENZANO (1947) ([44]) descrivono, per un ceppo isolato da mosto d'uva, la comparsa di cellule irregolari e di aspetto ameboide, cellule da interpretarsi come un fenomeno preludente, forse, la comparsa di pseudomicelio.

C. pulcherrima non ha molti sinonimi. Tra questi LODDER e KREGER VAN RIJ vi includono dubitativamente *Torulopsis rosea* BERLESE (1895), *Torula rubefaciens* GROSBÜSCH (1915), *Monilia* (*Cryptococcus*) *castellanii* RE (1925), *Asporomyces uvae* MRAK et MC CLUNG (1940) e le varietà *variabilis* LODDER (1934) e *rubra* CASTELLI (1940).

ECOLOGIA.

Candida pulcherrima sembra specie cosmopolita ed ubiquitaria. Con tutto ciò risulta particolarmente frequente sui fiori e sui frutti. Lo attestano i primi ricordati lavori di LINDNER, di BEIJERINCK e quindi di PUNKARI ed HENRICI, della PORCHET, di MELLIGER ([29]), di CASTELLI, di VERONA, FLORENZANO, ecc..

Diremo più avanti che, per quanto indicano questi ultimi lavori, *C. pulcherrima* è quasi costantemente presente nell'uva e quindi nei mosti in fermentazione. Ciò spiega un caso di affezione interdigitale descritto nel 1926 da POLLACCI e NANNIZZI in una persona addetta ad un'industria enologica e sostenuto da un *Cryptococcus interdigitalis* riconosciuto uguale a *C. pulcherrima*. Quest'isolamento, insieme ad altri due effettuati da bocca di persone sane e ammalate da ORIE in Olanda (1942) sono gli unici, forse, provenienti da materiale umano.

Ma, come si diceva, si ha l'impressione che i fiori e i frutti costituiscano l'habitat normale di *C. pulcherrima* tanto che la sua presenza nel terreno ([6]), nel tubo digerente di insetti o nell'uomo, ecc. ([5]) appare conseguente.

CARATTERI MORFOLOGICI E COLTURALI.

La prima succinta descrizione di LINDNER (1901) fu dallo stesso perfezionata nel 1930. Ulteriori notizie si sono avute in seguito fino a giungere alla comprensiva descrizione di LODDER e KREGER-VAN RIJ.

Secondo questi Aa. *C. pulcherrima* forma, in malto, cellule di assai varia forma e dimensioni. Sono infatti rotonde o corto-ovali di μ 3.5-9; ovali di μ (3-5.5) x (4-8.5) o anche molto lunghe di μ (2.5-3.5) x (8-16 e oltre).

Sono presenti anche cellule largamente rotonde di μ 6.5-9.5 contenenti una grossa goccia di grasso. Tali, distinte anche con il nome

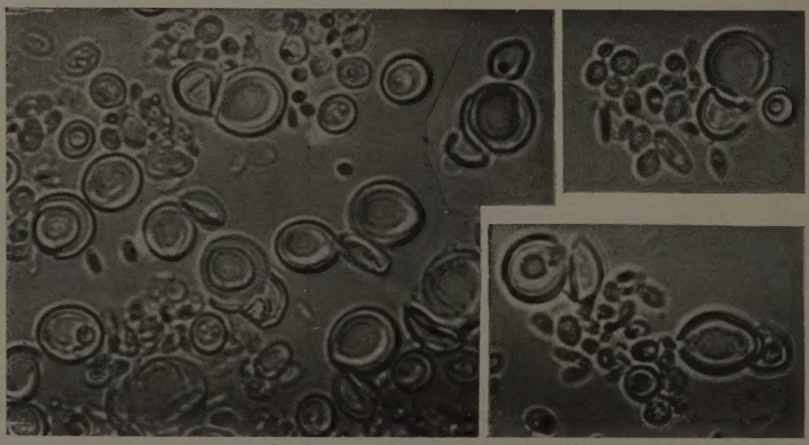


Fig. 1 - Alcuni aspetti morfologici di *C. pulcherrima*.

di « pulcherrima-cells », sono interpretate come clamidospore. Nel mezzo si forma sedimento, usualmente un anello e, talvolta, anche una leggerissima pellicola.

In agar-malto gli strisci sono molli, piatti, mucosi, lisci o leggermente increspati ai margini con zone pure increspate. Presentano colore giallo-crema o anche rosso per la formazione di un pigmento non-carotenoide.

Nelle colture in agar — e in particolare nelle vecchie colture — la maggior parte dei ceppi forma abbondanti clamidospore. Non è escluso che la maggiore o minore formazione di clamidospore sia legata alla natura del mezzo e, in particolare, ad una insufficienza di alimento azotato. VAN DER WALT ([41]) ad es. ha riscontrato abbondante formazione di queste clamidospore nel mezzo di STARKEY (glucosio 3%, estratto di lievito 0.01%, agar 2%). Queste clamidospore presentano il carattere della acido-resistenza. Nelle colture su porta-oggetto in agar-patata o carota la formazione di pseudomicelio è possibile e più o meno abbondante a seconda dei ceppi. Si tratta generalmente di cellule allungate disposte in catene talvolta ramificate.

SPORULAZIONE.

Nel 1938 WINDISCH pubblicò un lavoro che spostava sensibilmente i termini morfologici e sistematici di *C. pulcherrima*, avendo egli inteso osservare la formazione di spore.

Più esattamente. In vecchie colture è nota, come si è ricordato, la comparsa di più grandi cellule contenenti un grosso globulo oleoso. In queste cellule chiamate da WINDISCH « Riesenzellen » si osservano attaccati, talvolta, i resti di ciò che WINDISCH considera aschi rotti. In questi, prima della rottura, piccoli corpi rotondeggianti sono interpretati come ascospore.

In colture inquinate da un Penicillio WINDISCH osservò altresì, nelle grosse cellule, processi di copula previa formazione da parte delle stesse cellule di tubi copulativi attraverso i quali il nucleo veniva a spostarsi da una all'altra cellula copulante. Una di queste funzionerebbe come ascogonio a sua volta trasformabile, anche per l'aumento di dimensioni, in archegonio. Durante tale trasformazione anche il globulo oleoso aumenta di volume mentre si viene formando una seconda membrana esterna. Dopo qualche giorno dal carpogonio prende origine una protuberanza avvolta da sottile parete e quindi l'asco contenente quattro spore. L'asco si rompe; e le spore, varie di forma, si liberano, ingrandiscono e germinano. VAN DER WALT ([41]) in sue osservazioni non

sembra smentire quanto WINDISCH ebbe a descrivere. Anch'egli infatti vide trovarsi piccole cellule (due o raramente 4-5) trattenute entro la membrana delle clamidospore germinanti; ma diversa è l'interpretazione da lui data ai fatti osservati. In breve, secondo VAN DER WALT si tratta di normali processi di germinazione delle clamidospore così come avviene anche in altre specie di funghi.

La questione relativa la formazione di spore rimane dunque controversa. Personalmente noi pensiamo che non sia dimostrata e che sia esatta l'interpretazione data da VAN DER WALT ai fatti osservati da WINDISCH. Con tutto ciò non siamo dell'idea di doverla escludere a

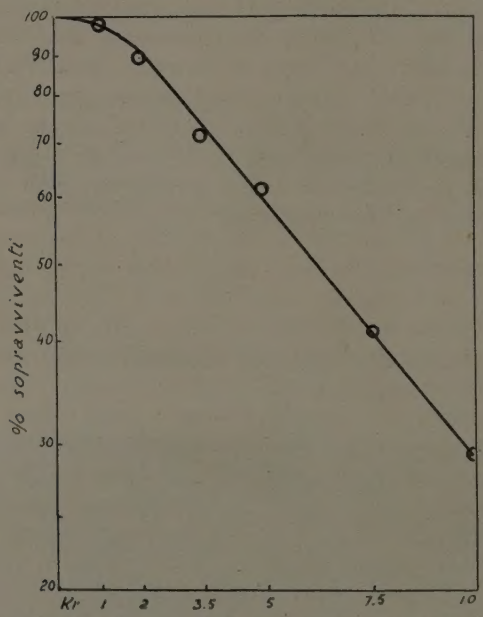


Fig. 2 - Curva di sopravivenza di *C. pulcherrima* ai raggi X (da MAGNI).

priori. Nel 1950 uno di noi (VERONA) pubblicò in una Rivista da lui controllata un lavoro di AGOSTINI, condotto presso SCHANDERL, nel quale si affermava la sporogenicità in *Brettanomyces* ([1]). Quel lavoro fu accolto con molte riserve; ma recentemente uno studio di VAN DER WALT comprova in *Brettanomyces* la formazione di spore ([42]). Per molto tempo *Torula lipofera*, isolata nel 1927 da DEN DOOREN DE JONG fu considerata come specie asporigena; ma nel 1952 LODDER e KREGER-VAN RIJ potevano riportare questa specie allo sporigeno genere *Lipomyces* ([25]).

Analoga possibilità non desideriamo escluderla per *C. pulcherrima*. E, in quest'idea, noi desideriamo anche tener conto delle indirette indicazioni relative l'assetto cromosomico rilevato attraverso le curve di sopravivenza ai raggi X costruite da MAGNI ([26]).

Tali curve seguono infatti l'andamento caratteristico presentato dai lieviti diploidi; quindi indicherebbero in *C. pulcherrima* l'esistenza di quelle condizioni di ploidia che appunto condizionano la sporulazione.

CARATTERI FISIOLOGICI.

C. pulcherrima ha un debole potere fermentativo solo per il glucosio. Il galattosio ora è scarsamente fermentato, ora no. Gli altri zuccheri non sono fermentati.

C. pulcherrima assimila glucosio, galattosio (poco), saccarosio, maltosio. No lattosio.

Non assimila l'azoto nitrico. Assimila (v. oltre nel presente lavoro) l'azoto ammoniacale, l'asparagina, l'urea. Conforme osservazioni di VERONA e PICCI ([46]) anche l'azoto atmosferico risulta utilizzato.

L'etanolo, come unica sorgente di carbonio, consente un sufficiente sviluppo.

L'arbutina è scissa.

La presenza di vitamine nel mezzo non sembra, secondo nostre osservazioni, indispensabile.

A 37° C. non sviluppa.

LA PRODUZIONE DI PIGMENTO.

Il primo a rilevare la produzione di pigmento da parte di *C. pulcherrima* fu LINDNER nel 1915 ([23]) casualmente rimarcando che possono apparire, nelle colture, « rötlich gefärbte kolonien ». Nello stesso anno seguì una serie di osservazioni di GROSBÜSCH ([15]). Lavorando con *Torula rubifaciens* riconosciuta poi come *C. p.* egli notò che tale lievito forma pigmento nei mezzi più diversi, sia liquidi che solidi e che tale pigmentazione dipende da quattro diversi fattori. Influisce in primo luogo la natura della sorgente carboidrata: infatti più evidente pigmentazione si ottiene in presenza di arabinosio, raffinosio, maltosio, lattosio e galattosio che non in presenza di saccarosio comunque migliore di glucosio e fruttosio. Influisce poi la concentrazione dello zucchero presente nel mezzo; quindi il tempo di sterilizzazione risultato inversamente proporzionale alla intensità di pigmentazione; e infine il grado di

acidità in quanto la presenza di acido tartarico manifesta azione negativa.

Nel 1918 apparvero i classici lavori di BEIJERINCK ([4]). Egli affermò che la produzione di pigmento è legata alla presenza di ferro nel mezzo di coltura e chiarì che *C.p.* origina un precursore incolore capace di reagire col ferro per dare il pigmento. Tale capacità sarebbe comunque una proprietà instabile legata a processi di mutazione.

Seguirono di poi i lavori di PUNKARI ed HENRICI (1933-35). ([35]). Essi osservarono il formarsi, in colonie giganti, di fenomeni di variazione rappresentati dall'apparire di settori, anelli o macchie di pigmento. Notarono altresì il comparire, oltre che delle varianti bianche e rosse, di varianti lisce e rugose, varianti tutte che sembrano apparire indipendentemente le une dalle altre anche se le più frequenti sono le rosse-lisce, rosso-rugose e bianco-rugose. Ascrivono le cause di queste variazioni ad una sorta di selezione artificiale stabilentesi nel corso delle ricerche e al fatto che, il grado di mutabilità delle colonie giganti aumenta con il tempo.

Nel 1938 comparve il lavoro della PORCHET ([33]). Studiati 10 ceppi isolati da frutta PORCHET, dopo avere notato che il pigmento prodotto da *C. p.* è diverso da quello di natura lipocromica prodotto da *Rhodotorula* e da *Sporobolomyces*, non ritiene, contrariamente alla opinione di BEIJERINCK, che la formazione dello stesso pigmento sia dipendente dalla presenza di ferro, quanto piuttosto legata a non noti fattori interni.

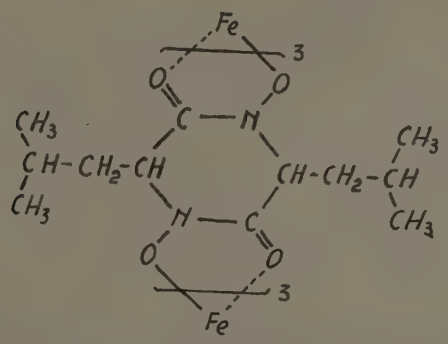
CASTELLI, poco dopo, avvalorava invece i risultati di BEIJERINCK ([7]). Pari variazioni di colore furono ancora notate in *C. p.* da ROBERTS in certi studi comparativi condotti con *Taphrina deformans* ([38]). Essa inclina a correlare l'insorgere di tali variazioni ai processi sporulativi descritti da WINDISCH; però, in successivo lavoro, non trascura di studiare l'influenza che, sulla produzione di pigmento, hanno, con il ferro risultato favorevole, altri fattori: quali l'ossigeno che, come notato da BEIJERINCK, manifesta anch'esso favorevole azione, e la luce e temperatura che non esercitano, invece, alcuna influenza.

Nel 1952 apparve finalmente un esauriente e decisivo studio di VAN DER WALT ([41]) seguito da altro di KLUYVER e Coll. ([18]).

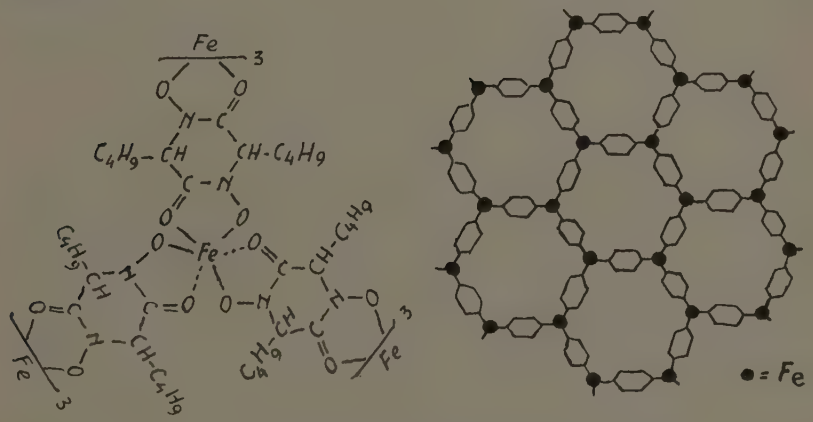
Ottenuta una mutante rossa VAN DER WALT studiò prima i fattori che determinano il comparire della mutante cromogena; quindi isolò e studiò chimicamente il pigmento.

In quanto ai fattori influenti la cromogenesi i risultati del ricordato Autore contrastano nei riguardi dell'azione dei carboidrati con quelli di GROSBUSCH; è ancora confermata, invece, la favorevole azione del ferro e dell'ossigeno.

Per quanto si riferisce al pigmento chiamato « pulcherrimina » fu visto trattarsi di un complesso ferrico di N-idrossi 3,6-di-sec-butil 2,5-dicheto-piperazina dalla seguente formula:



Tale unità trovasi legata a formare complessi molecolari del tipo seguente:



la pulcherrimina

nella sua unita' *e nel suo complesso*

E' interessante notare come *C. p.* formi vari altri pigmenti allorquando nel mezzo di coltura il ferro sia sostituito da rame, cobalto, nichel e titanio. Conseguentemente si formano composti analoghi alla pulcherrimina e solo diversi in funzione del metallo che ha sostituito il ferro.

La definizione di pulcherrimina chiarisce così la natura della pigmentazione in *Candida pulcherrima*. Il suo interesse biologico — diremo occasionalmente — va peraltro al di là delle questioni relative a *C. p.* in quanto la sua presenza « is apparently not at all restricted to *C. pulcherrima* » (VAN DER WALT).

FENOMENI DISSOCIATIVI.

Sul ricorrere, in *C. pulcherrima*, di fenomeni dissociativi più volte si è fatto cenno.

In sintesi tali fenomeni dissociativi interessano l'abito morfologico e l'aspetto colturale.

Il quadro morfologico tipico e normale è quello di cellule globose, ovoidi o più o meno allungate ed ellittiche, miste a clamidospore solitamente sferiche o subsferiche, più grandi delle normali, caratteristicamente contenenti un grosso globulo di grasso e presenti in numero maggiore o minore a seconda delle condizioni di substrato. La deviazione morfologica più frequente è quella relativa la formazione di cellule allungate e disposte in catena a costituire pseudomicelio come già da tempo è stato rilevato e confermato. Meno frequente è la formazione di cellule irregolari e di aspetto ameboide come ebbero a descrivere VERONA e FLORENZANO.

Questo primo fatto dissociativo tende quindi a portare la specie dalla forma L (lievito) alla forma M (miceliare).

Dal punto di vista colturale i fenomeni dissociativi si estrinsecano attraverso le vegetazioni su agar nelle due fasi liscia e rugosa.

Finalmente, dal punto di vista fisiologico, gli stessi fatti interessano — stabilendosi opportune condizioni — la produzione o meno di pigmento.

Riassuntivamente sono pertanto possibili i passaggi seguenti:

forma lievito (L) ——→ forma filamentosa (M)
colonie lisce (S) ——→ colonie rugose (R)
colonie bianche (W) ——→ colonie rosse (Pr)

C. pulcherrima ci si presenta così come una specie dotata di un certo dinamismo e di una certa instabilità.

CICLO DI SVILUPPO E POSIZIONE SISTEMATICA.

Se, come attualmente è giusto pensare, noi consideriamo *C. pulcherrima* come specie asporigena il ciclo vitale presentato da VAN DER

WALT e qui riprodotto è certo quello che meglio riflette le più concrete e dimostrabili conoscenze che oggi abbiamo sulla specie.

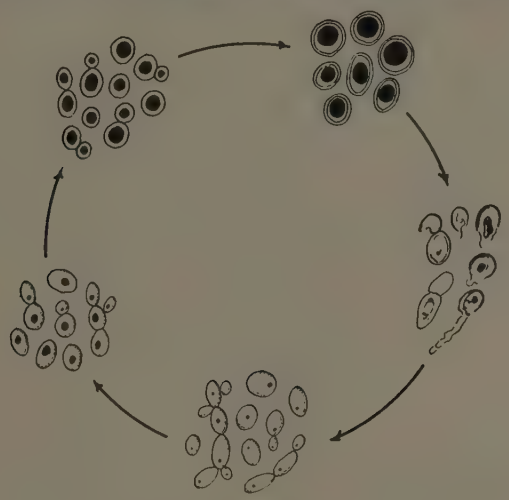


Fig. 3 - Il ciclo vitale di *C. pulcherrima* secondo van der Walt.

In brevi termini. In un mezzo nutrizionalmente bilanciato le giovani colture si presentano costituite di cellule rotonde od ovali normalmente moltiplicantesi per gemmazione: e questo fino a che il mezzo rimane favorevole. Facendosi meno alcuni componenti nutritivi, specie azotati, il processo di gemmazione rallenta; il complesso della popolazione tende ad assumere allora la forma sferica mentre nelle singole cellule vengono a formarsi quantità notevoli di lipidi.

Queste cellule e i globuli lipidici aumentano di dimensioni fino ad assumere il caratteristico aspetto delle cellule qualificate come « cellule-pulcherrima ». Un ulteriore inspessimento della parete fa assumere a queste cellule le caratteristiche delle clamidospore. Durante il periodo di dormienza le clamidospore attingono il loro fabbisogno energetico alle riserve lipidiche. Finalmente, stabilendosi opportune condizioni di sviluppo, queste o si moltiplicano per gemmazione o germinazione dando origine alle normali forme vegetative a loro volta moltiplicantesi per gemmazione. Come la formazione di pseudomicelio è possibile, il descritto ciclo potrebbe peraltro perfezionarsi nel modo di seguito figurato.

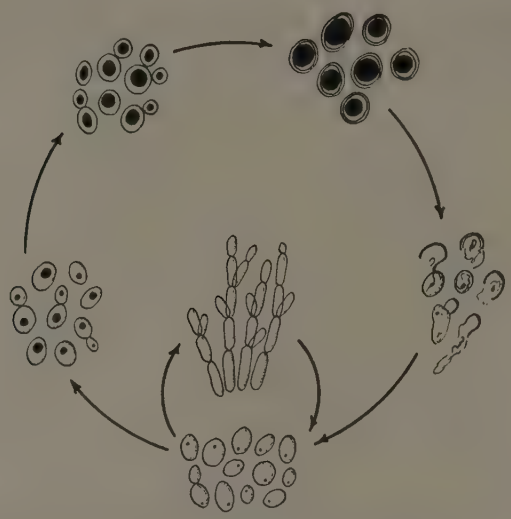


Fig. 4 - Lo stesso ciclo leggermente modificato, dovendosi tener conto dei processi di variazione L M.

Diverso appare il ciclo vitale qualora si voglia ammettere la formazione di spore conforme il pensiero, già ricordato, di WINDISCH. Insieme ai lavori di questo A. occorre peraltro riferirsi anche ai successivi di ROBERTS. Questi, nel riprendere l'argomento, conduce uno studio comparativo tra *C. pulcherrima* e *Taphrina deformans*. Nei riguardi di *C. pulcherrima* non riesce a confermare alcune osservazioni di WINDISCH come ad es. la fuoriuscita delle spore dagli aschi, la germinazione delle indicate spore e la condizione binucleata delle cellule. Vengono invece chiaramente evidenziate alcune analogie strutturali, fisiologiche e colturali tra le due specie tali da far pensare, secondo ROBERTS, ad un effettivo legame tra *C. pulcherrima* e i Taphrinali anche se, soggiunge subito la stessa ROBERTS, occorrano a tal fine ulteriori più approfonditi studi.

Ad ogni modo se il punto di vista di WINDISCH dovesse essere confermato il ciclo biologico di *C. p.*, in quanto inserito in quello di *Taphrina deformans* verrebbe a presentarsi sostanzialmente diverso da quello prima indicato (vedi fig. 5).

Circa infine il riferimento sistematico questo ovviamente consegue l'ammissione o meno da parte della specie della sporogenicità.

WINDISCH, nell'ammetterla sporigena ed estendendo tale proprietà al gen. *Candida*, istituisce la Famiglia delle *Candidaceae* e riporta questa agli *Exoascales*.

Se, con i più, la formazione di spore non si intende dimostrata *C. pulcherrima* deve forzatamente rientrare nelle *Criptococcaceae*. Infatti per un certo tempo essa fu riferita al gen. *Torulopsis;* quindi, sopravalutandosi la capacità a formare prseudomicelio, da *Torulopsis* fu trasferita in *Candida*. Tale ultima sistemazione risulta oggi quasi universalmente accettata.

Noi non intendiamo, ora, entrare in discussione su questo argoment. Ma a termine del presente lavoro (vedi) avanzeremo, nei riguardi di tale sistemazione, ragionate riserve.

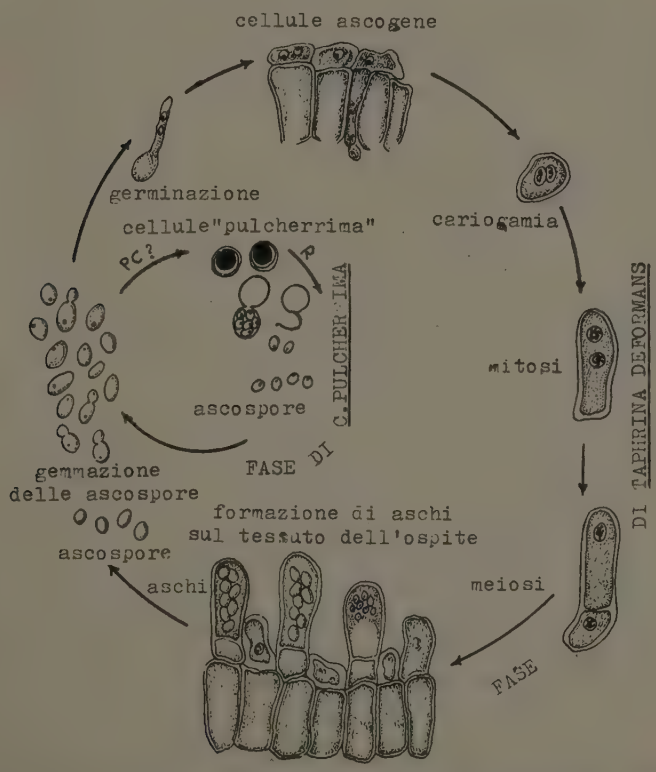


Fig. 5 - Possibile inserimento di *C. pulcherrima* nel ciclo di sviluppo di *T. deformans*.

ALTRE NOTIZIE.

Già dalle prime ricerche zimologiche sistematicamente condotte dalle Scuole Italiane sugli agenti della fermentazione vinaria risultò chiara la particolare frequenza di *C. pulcherrima* nei mosti d'uva. (8, 9, 11, 12, 13, 27, 30, 31, 34, 45).

CASTELLI e i suoi Collaboratori nei loro numerosi studi l'hanno segnalata presente nei mosti della Calabria (4%), Lazio (4%), Marche (13%) come già avevano segnalato VERONA e LUCHETTI, Piceno (7%), Puglie (22%), Toscana (17%), Umbria (6%), ecc, mentre MALAN la rinveniva nei mosti del Piemonte e FLORENZANO, in Toscana, nei mosti di « governo » o di rifermentazione.

Ancora in mosto d'uva è stata quindi rinvenuta da MRAK e MC CLUNG in America ([31]), da DOMERCQ nei mosti della Gironda ([11]), da VERONA, MELAS-JOANNIDIS, PICCI ed altri nei mosti della Grecia ([30]) da MARQUES-GOMES nei mosti del Portogallo...

Tali rinvenimenti frequenti dovevano suggerire pertanto qualche più dettagliata ricerca.

CASTELLI, intanto, già aveva notato che *C. pulcherrima* ha una debole capacità alcooligena oscillando il suo rendimento in etanolo tra l'1.84 e il 3.26% in peso.

VERONA, in più esteso studio ([43]), conferma tale debole potere fermentativo peraltro risultato variabile da ceppo a ceppo e trova che esso non è suscettibile di aumentare nè in presenza di fosfati nè in mezzi tamponati. Nelle stesse ricerche VERONA nota come *C. pulcherrima* possa svilupparsi anche in presenza del 14% (in vol.) di alcool etilico e in presenza di acidi come ac. lattico (4‰) e ac. tartarico (8 per mille).

Ulteriori precisazioni sul rendimento in alcool e la produzione di ac. volatile risultano ancora da altre ricerche eseguite da MELAS-JOANNIDIS, PICCI, VERONA e altri su ceppi isolati da mosti della Grecia. Per questi ceppi fu indicata una produzione in alcool del 2.4 ± 0.313% e una produzione di acidità volatile in millieq. di ac. acetico per molecola di alcool pari al 7.2 ± 1.032 (in g/l di ac. acetico la media dette lo 0.180).

C. pulcherrima è quindi un lievito a scarsa attività fermentativa. Peraltro, FLORENZANO ([14]), osservando nei liquidi fermentati costante presenza di acido piruvico pensò che, così scarso rendimento, fosse dovuto a insufficienza carbossilasica, insufficienza che forse poteva essere rimossa per aggiunta di tiamina nel mezzo. Sperimentando in questo senso egli infatti riuscì ad elevare la produzione di alcool, in due diversi ceppi, dal 2.4-2.7% al 4.2-5.8%.

Completano queste ricerche i dati, finalmente, di RIBÉREAU-GAYON e PEYNAUD ([37]). Così, tali Aa. nel loro Trattato di Enologia:

intensità respiratoria: $Q_{O_2} = 27 - 29$ $Q_{CO_2} = 36 - 43$ $\frac{Q_{CO_2}}{Q_{CO_2}} = 89$

potere alcooligeno in anaerobiosi = 0.8-2.4%.

Bilancio dei prodotti secondari della fermentazione di un mosto d'uva (quantità in millimol. per litro) in anaerobiosi

grado	glicerina	ac. acet.	ac. succ.	2,3-butil.	etanal	E	E/g
0.8	36	9.3	3.9	1.6	0.2	40	1.10

II - *RICERCHE COMPARATIVE TRA C. PULCHERRIMA E CEPPI AD ANALOGA FISIONOMIA.*

PROVENIENZA DEI CEPPI.

Le ricerche comparative delle quali si riferisce sono state condotte con i ceppi seguenti, così raggruppati ed elencati:

A. *Gruppo di C. pulcherrima*

1 - ceppo « ameboide » VERONA e FLORENZANO (in coltura dal 1947)
2 - ceppo « Brasile 7 » isolato da fiori di vite (VERONA e ZARDETTO DE TOLEDO 1954) ([49])
3 - ceppo « Italia 69 » isolato da mosto d'uva (VERONA, 1952)
4 - ceppo n. 2984 della collezione del Prof. CASTELLI isolato da mosto d'uva di Lucera
5 - ceppo n. 2994 della collezione del Prof. CASTELLI isolato da amarena a Pescara
6 - ceppo n. 2995 della collezione del Prof. CASTELLI isolato da mosto d'uva dell'Isola d'Elba
7 - ceppo n. 610 del Centraalbureau voor Schimmelcultures
8 - ceppo n. 2244 del Centr. v. Schimmelcultures

B. *Gruppo dei ceppi isolati da specie di Eucaliptus*

9 - ceppo II—12 isolato il 13-V-60 da *E. globulus*
10 - ceppo I—6 isolato il 13-V-60 da *E. leucoscilon*
11 - ceppo VI—2 isolato il 13-V-60 da *E. maidenii*
12 - ceppo II—14 isolato il 13-V-60 da *E. globulus*

13 - ceppo V—9 isolato il 13-V-60 da *E. paulistana*
14 - ceppo I—13 isolato il 13-V-60 da *E. leucoscilon*
15 - ceppo XII—1 isolato il 10-VII-60 da *E. maidenii*
16 - ceppo XIII—1 isolato il 13-V-60 da *E. sp.*

C. *Gruppo di Candida Reukaufii*

17-18-19-20-21, subcolture tutte provenienti da un unico ceppo, già a parte descritto ([47]).

CARATTERI COLTURALI.

Su infuso di malto tutti i ceppi dei tre gruppi sviluppano bene dando origine ad un sedimento bianco; dopo un mese si può formare anello; una sottilissima non continua membrana si è vista formare nei ceppi n. 3-4-5-6.

Su agar-malto, patine che sviluppano facilmente sotto forma di vegetazione bianco-giallastra nei gruppi A e B e biancogiallastra con tendenza al grigio nel gruppo C. Nei ceppi n. 5 e 6 comparsa di pigmentazione rossa. E' patina opaca, densa, poltacea, liscia appena si eccettuino i ceppi N. 2, 5, 9, 18. In questi la vegetazione si presenta invece più o meno verrucosa e strutturata. E' carattere, peraltro, che non si mantiene costante con i diversi passaggi. Nel retro le patine presentano zone di colore ocraceo.

Su patata tutti i ceppi sviluppano bene sotto forma di patina secca, un po' rilevata, opaca, di colore bianco-grigiastro sporco con tendenza ad ingiallire. Comparsa di pigmento rosso nei ceppi n. 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8 (*C. pulcherrima*).

CARATTERI MORFOLOGICI.

Crediamo utile tenere distinte, nella descrizione dei caratteri morfologici, le cellule che consideriamo normali dalle cellule qualificate come clamidospore e da altri tipi cellulari eventualmente presenti.

Cellule normali.

I ceppi del gruppo A (*C. pulcherrima*) hanno dato origine, in malto, a cellule globose, corto-ovali od ovalari, misuranti in media, globamente μ (3.5-5) x (5.2-8.4).

Nei ceppi del gruppo B si è pure notata una certa eterogeneità morfologica; ma sono apparse ben rare le forme globose e più frequenti le forme ovali ed ovato-ellittiche. Le dimensioni sono oscillate, in grande media, intorno ai μ (2.6-5.2) x (5.2-8.4).

I ceppi del gruppo *C. Reukaufii* hanno presentato, invece, un quadro assai differente dai precedenti con maggiore uniformità morfologica presentando cellule costantemente più o meno cilindriche di μ 2.4-3.2 x 7.8-12.

La *gemmazione* si compie, in ogni caso, in modo tipico formandosi di solito una gemma ad uno dei poli.

E' peraltro da osservare che, nelle cellule ovalari e sopratutto allungate (gruppo *B* e *C*) la cellula figlia non sempre si forma in posizione rigorosamente polare; all'opposto la gemmazione ha luogo soli-

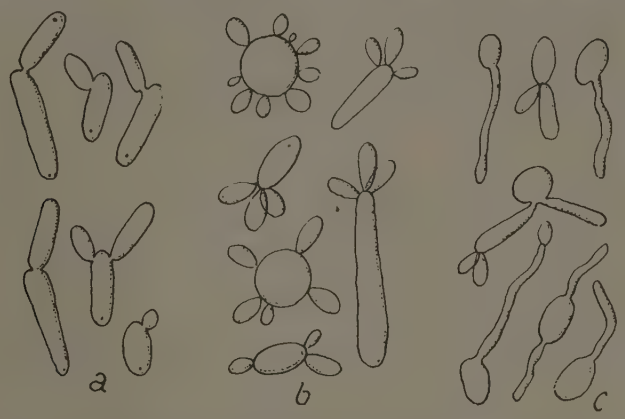


Fig. 6 - Processi di gemmazione.
a, gemmazione distale-obliqua; *b*, gemmazione multipla nei ceppi 13 e 18; *c*, formazione di tubo promicelico.

tamente in posizione distale-obliqua. La formazione di due gemme non è infrequente; in certe condizioni colturali non è poi rara la gemmazione multipla. Tanto, ad esempio, abbiamo osservato in presenza di certi zuccheri (lattosio) oppure in presenza di etanolo.

E' da aggiungere come nei ceppi in dissociazione verso la forma M molte o moltissime cellule diano origine, invece di gemmare, ad una specie di tubo promicelico, ossia ad un prolungamento d'altronde capace, a sua volta, di gemmare.

Clamidospore.

La caratteristica morfologica dei ceppi in esame consiste nella presenza — accanto alle cellule normali — di cellule più grandi costantemente provviste di grossa goccia oleosa. Talvolta la massa lipoidica si fa così grande da occupare tutto il territorio della cellula. Già

sappiamo che molti designano queste cellule, con riferimento al gruppo *A*, con il termine di « cellule-pulcherrima » e tutti o quasi concordano nel ritenerle clamidospore. Così dicasi per le cellule del gruppo *C* da taluno denominate « *daurzellen* » ([32]).

Il rapporto tra cellule normali e clamidospore è estremamente variabile in dipendenza del ceppo e, sopratutto, delle condizioni colturali (*). Scarse, ad esempio, in infuso di malto, si fanno numerosissime in mezzi azoto-carenti. Tali e per tutti i ceppi le abbiamo ad es. trovate in un mezzo costituito da glucosio 3%, estratto di lievito 0.01%, agar 2%.

Le clamidospore del gruppo *A* (*C. pulcherrima*) rispondono per forma e dimensioni a quelle tante volte descritte dagli Autori. Sono globose, subsferiche, raramente ovalari e misurano in diametro da μ 6 circa fino a μ 10 e anche 12. La goccia oleosa è solitamente grande e centrale.

Le clamidospore del gruppo *B* si presentano ovalari o subellittiche, di μ (3.6-5.2) x (6-8.4-9.1). La goccia oleosa è grande e centrale con possibilità di estendersi ad occupare tutto o quasi lo spazio cellulare. Nell'agar all'estratto di lievito sopra ricordato qualche ceppo ha peraltro dato quadri morfologici assai simili a quelli descritti per il gruppo *A*.

Le clamidospore, infine, del gruppo *C* (*C. Reukaufii*), sono ovalari od ellittiche e differiscono dalle precedenti per le dimensioni veramente notevoli misurando μ (5.8-6.6-7.8) x (14.4-15.6-18.2). Sono quasi completamente piene di grasso oppure di numerose dense granulazioni lipidiche. In mezzi agarizzati azoto-carenti spesso si osservano catenulate.

Qualsiasi sia il tipo morfologico e dimensionale, in tali grosse cellule la membrana cellulare ad un certo momento si rompe (generalmente di lato nelle cellule ovalari) e la massa oleosa viene lentamente protusa al di fuori organizzandosi in una nuova cellula. La membrana della cellula di origine rimane vuota di contenuto ed isolata o altrimenti permane, vuota, aderente alla nuova cellula. E' così (vedi anche VAN DER WALT per *C. pulcherrima*) che si originano quelle figure segnalate da WINDISCH e da lui intese legate a processi di sporulazione. Il fatto, d'altronde, è comune anche ad altri funghi come ad esempio nelle specie di *Taphrina* (**). Scrive ad es. MARTIN, nei riguardi di queste

(*) Varia anche, tale rapporto, con l'isolamento. Vi sono ceppi che, in primo isolamento, si presentano esclusivamente o quasi sotto forma clamidosporica.

(**) Daltronde, ciò che in coltura è inteso e descritto come *Taphrina* è forse da riportarsi, e in alcuni casi sicuramente, a specie di lieviti ([46]).

specie, che la germinazione di simili cellule « consisted of the rupturing of the thick wall of the spore, either at one end or one side, and the outwrd projection of the contents ».

A parte questo descritto processo tali cellule provviste di grasso gemmano normalmente o altrimenti, nei ceppi in via di dissociazione, danno anch'esse origine come le cellule normali a specie di tubi promicelici più o meno lunghi.

Le forme ameboidi.

Un aspetto ameboide rappresentato da cellule a forma lobosa e irregolare fu già descritto per *C. pulcherrima* da VERONA e FLORENZANO nel 1947 come altrove ricordato. A distanza di anni questo ceppo presenta ancora qualche cellula di questo tipo.

Fig. 7 - Forme ameboidi nel ceppo 1 (a) e nel ceppo n. 15 (b).

Nella serie, poi, dei ceppi studiati abbiamo trovato che tale aspetto è presentato anche dal ceppo n. 15 appartenente al gruppo *B*.

Non è la prima volta che, nei lieviti, si descrivono figure del genere, peraltro non frequenti.

Una prima descrizione, forse, si ha in GUILLIERMOND e TANNER ([17]) per *Zygosacch. Bailii* (Lindner) Guill. e relazionato a fatti sessuali: ...« In this manner very peculiarly straped cells are secured which look like amebae. Without much doubt Lindner observed analogous forms in the pellicle of culture of *Sacch. Bailii*. The form of copulation in this yeast. The ameboid cells represent, then, unsuccessful copulation ».

Successivamente formazioni ameboidee furono descritte e figurate da KRUMBHOLZ ([19]) per una specie osmofila, distinta come nuova, denominata *Zygosaccharomyces ameboideus* e oggi ritenuta uguale a *Sacch. rouxii* Boutroux var. *polymorpha* (Kr. et Kr) LODDER et KREGER-VAN RIJ. Anche qui, tali formazioni, sono in evidente rapporto ai fenomeni copulativi che accompagnano la formazione dell'asco.

Altra segnalazione si deve a SACCHETTI ([40]) per una sua varietà *casei* di *Sacch. mangini* oggi considerata sinonimo di *Sacch. chevalieri* Guill. Pur rilevando l'analogia morfologica con le figure descritte da KRUMBHOLZ, SACCHETTI ritiene peraltro che esse non siano in rapporto ai processi di sporulazione. VERONA e FLORENZANO nel descrivere per *C. pulcherrima* tali formazioni ameboidi ugualmente dubitano che si tratti di figure legate allo stabilirsi di processi sessuali; ritengono che si tratti di un processo dissociativo che preluda il passaggo dalla forma L alla forma M. In ogni caso si osserva come la comparsa delle forme ameboidi parta, il più delle volte, da una cellula che si ingrandisce, si deforma, originando talvolta uno o più prolungamenti che a lor volta ingrandiscono o anche si fondono.

Lo pseduomicelio.

Occorre riferirci agli studi della PORCHET. Nel 1938, come altrove ricordato, studiando dieci ceppi di *C. pulcherrima* quest'Autore notò, in alcuni, la formazione di pseudomicelio a seguito di processi dissociativi.

Pari osservazione fu quindi fatta da WINDISCH (1938-40) tanto che lo stesso propose il trasferimento di *T. pulcherrima* nel gen. *Candida,* indipendentemente dalla posizione del genere che vorrebbe riallacciato agli Exoascali.

La possibile formazione di pseudomicelio è stata quindi normalmente ammessa per *T. pulcherrima* e le stesse LODDER e KREGER-VAN RIJ accettano l'attribuzione della specie nel gen. *Candida.*

Tale riferimento che nessuno, a quanto ci consta, ha inteso fino ad oggi discutere ci dispenserebbe da ogni ulteriore considerazione. Con tutto ciò riteniamo utile riferire qualche nostra osservazione quale si è annotata studiando i ceppi n. 3 e 5 del gruppo A e il ceppo n. 18 del gruppo C.

Il ceppo n. 3, allorquando fu isolato, presentava i caratteri tipici di *C. pulcherrima,* assente ogni forma pseudomiceliare. Fu isolato da mosto d'uva nel 1952 ed è stato mantenuto in collezione su agar-malto. Quando fu inserito nel presente studio al controllo microscopico apparì in forma quasi completamente filamentosa. Così osservammo che

lo pseudomicelio si origina dall'allungamento delle singole cellule o dal formarsi di tubi che si accrescono e che poi originano altre cellule allungate. Questo processo è comune sia alle cellule normali che alle cellule tipo « pulcherrima ». Si noti che sovente la formazione della nuova cellula avviene in posizione distale-obliqua (come altrove rilevato) e che, quando sviluppata, si presenta un poco più larga da una parte, meno dalla parte da cui ha preso origine. Tali cellule sono ora sottili di μ 2.6-3.2 circa, ora un poco più grosse fino a μ 4.2-5: in quest'ultimo caso racchiudono globuli oleosi. Sono lunghe fino a μ 26.

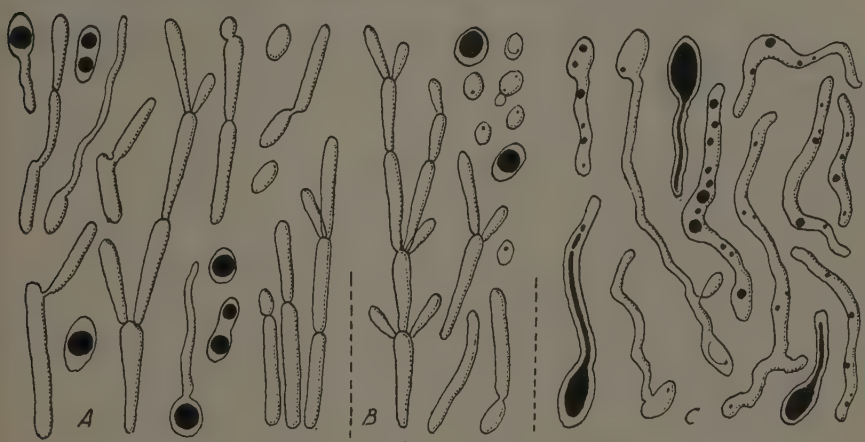


Fig. 8 - Figure pseudomiceliari relative i ceppi n. 3 (A), n. 5(B) e n. 18 (C).

Il ceppo n. 5 ripete i caratteri del ceppo n. 3. Permangono se mai, più frequenti, miste alle formazioni pseudomiceliari le cellule normali e quelle di tipo « pulcherrima ».. Così in agar-malto.

Il ceppo n. 18 fa parte del gruppo C. In esso si notano filamenti sinuosi spesso serpentiniformi, larghi μ 2.2-2.8 e più o meno lunghi fino a μ 30-40 e anche oltre. Tali prendono origine dalle grosse cellule oleose, ma anche dalle altre cellule che, invece di gemmare, danno origine ad una protuberanza tubiforme destinata ad allungarsi.

Il quadro generale che si osserva nelle colture su vetro porta-oggetti è dato comunque da cellule più o meno lungamente cilindriche disposte in catene semplici o ramificate.

La formazione di pseudomicelio è quindi possibile: però è *occasionale* e da interpretarsi come espressione di fatti dissociativi.

Riassumendo i tre gruppi non presentano, dal punto di vista organizzativo, sostanziali differenze. Si hanno in ogni caso per quanto di sicuro è noto, cellule normali e clamidospore; insorgendo fatti dissociativi il formarsi di pseudomicelio è possibile.

Differenze sussistono tra i tre gruppi qualora si faccia caso, però, ai caratteri morfometrici delle cellule normali come delle clamidospore.

Per quanto si riferisce alle cellule normali queste sono pressochè identiche nei due gruppi *A* (*C. pulcherrima*) e *B*. Diverse sono quelle del gruppo *C* (*C. Reukaufii*). Per quanto si riferisce alle clamidospore esse sono invece diverse nei tre diversi gruppi: globose nel gruppo *A* (*C. pulcherrima*), ovalari nel gruppo *B*, ancora ovalari ma di molto maggiori dimensioni nel gruppo *C* (*C. Reukaufii*). L'organizzazione dello pseudomicelio è in ogni caso pressochè identica.

CARATTERI FISIOLOGICI.

— *Fermentazioni*

	gruppo A	gruppo B	gruppo C
glucosio	+	+	+
galattosio	+ o —	—	—
saccarosio	—	—	—
maltosio	—	—	—
lattosio	—	—	—
raffinosio	—	—	—

— *Assimilazione delle sorgenti di carbonio*

	gruppo A	gruppo B	gruppo C
glucosio	+	+	+
galattosio	+ (deb.)	+ (deb.)	+ (deb.)
saccarosio	+	+	+
maltosio	+	+	+
lattosio	—	—	—
arabinosio	—	—	—
xilosio	+ (deb.)	+ o —	+
ramnosio	—	—	—
α-metilglucoside	+ o —	—	—
glicerina	+	+	+
mannite	+	+	+
inulina	—	—	—

— *Etanolo come unica sorgente di carbonio*

gruppo A: Sviluppo buono in tutti i ceppi. Nel ceppo n. 3 e 4 leggera pellicola

gruppo B: Sviluppo scarso in tutti i ceppi

gruppo C: Sviluppo discreto

— *Utilizzazione delle comuni sorgenti di azoto*

	gruppo A	gruppo B	gruppo C
peptone	+	+	+
asparagina	+	+	+
urea	+	+	+
solfato ammonico	+	+	+
KNO_3	—	—	—
senza azoto	sviluppo lento ma possibile ed evidente ([46])		

— *Utilizzazione degli aminoacidi*

Nell'idea di rinvenire qualche differenza nella utilizzazione dei vari aminoacidi, tutti i ceppi in studio furono coltivati in adatto mezzo liquido privo di azoto ma addizionato dei vari aminoacidi nelle quantità corrispondenti allo 0.2% di azoto. Quantità doppie per i composti in forma *dl*. Incubazione a 26°C. e lettura dello sviluppo alla 48° ora mediante rilevamento nefelometrico.

I risultati sono espressi nell'allegato diagramma che segna, per ogni aminoacido, lo sviluppo minimo e massimo di ogni ceppo compreso nei tre gruppi *A, B, C*.

L'esame di questo grafico indica che, nel complesso, non compaiono differenze indicative nel comportamento dei tre gruppi che sembrano dunque utilizzare tutti e in ugual maniera i diversi aminoacidi.

— *Sviluppo in assenza di vitamine*

Possibile per tutti i ceppi dei tre gruppi

— *Scissione dell'arbutina*

Positiva per tutti i ceppi dei tre gruppi.

— *Sviluppo in sol. zuccherine concentrate*

In acqua di lievito addizionata di glucosio nelle quantità di gr 24.1 - 40.2 - 56.2 - 62% (cioè in mezzi aventi rispettivamente una pressione

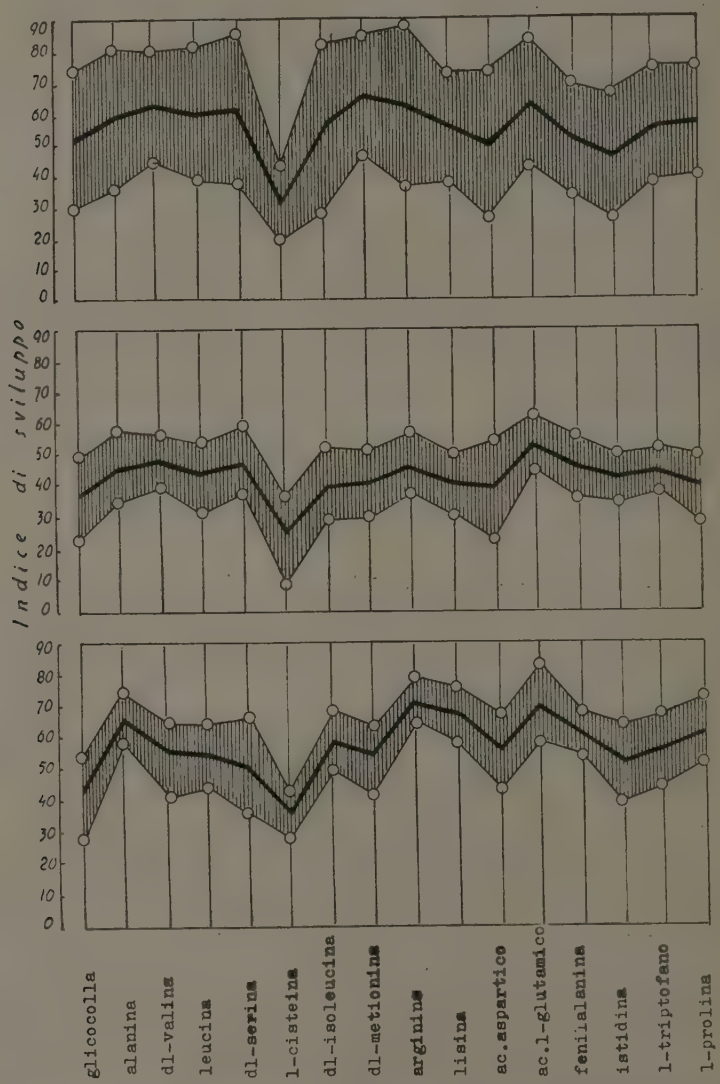


Fig. 9 - I grafici indicano lo sviluppo (minimo o massimo) dei ceppi studiati in presenza di aminoacidi. In alto, dei ceppi di *C. pulcherrima* (gruppo *A*) in centro, dei ceppi del gruppo B e, in basso, dei ceppi del gruppo C (*C. Reukaufii*).

osmotica di atm. 30-50-70-80) lo sviluppo fu positivo per tutti i ceppi dei tre gruppi.

— *Sviluppo a* 37° C.

Negativo per tutti i ceppi dei tre gruppi.

Riassumendo non sembra sussistere nessuna differenza, sul piano fisiologico, tra i tre diversi gruppi . Anche la tolleranza alle elevate pressioni osmotiche — non prima d'ora saggiata — è carattere comune.

III — *CONSIDERAZIONI SISTEMATICHE.*

Le vicende sistematiche di *Torulopsis* (*Candida*) *pulcherrima* e alla quale sono da riferirsi i ceppi del gruppo A cui al presente studio, hanno segnato due tappe. La prima fa riferimento al gen. *Torulopsis*, la seconda al gen. *Candida*.

L'attribuzione al primo genere poteva essere provvisoriamente accettata. In fondo si trattava di inquadrare una specie di lievito asporigeno i cui caratteri potevano sovrapporsi abbastanza bene a quelli di *Torulopsis* salvo la presenza costante di clamidospore, caratterizzate dalle dimensioni maggiori delle cellule normali e dalla presenza di grossa goccia oleosa: carattere che poteva essere preso come distintivo della specie.

L'attribuzione al gen. *Candida* proposta da WINDISCH e giustificata per l'apparire di fatti dissociativi, può apparire invece più discutibile. Infatti tale attribuzione si basa non su di un carattere *costante* quale è, per il gene *Candida*, la formazione di pseudomicelio (sia pure, come avvertono LODDER e KREGER-VAN RIJ « more or less abundantly developed »), ma su di una *tendenza a formare pseudomicelio* a seguito, come si è detto, di fatti dissociativi; tanto che può anche non formarsi.

Ora sembra a noi che la specie debba rispondere in maniera costante ai caratteri tipici del genere nella sua fase « normale » e non nella sua fase « dissociata ». E questo non è il caso di *C. pulcherrima*. In ogni modo e indipendentemente dalle interpretazioni di WINDISCH non appare sufficientemente valutata la presenza *costante* (e a volte prevalente o quasi esclusiva) di *tipiche* clamidospore.

Occorre riconoscere che siamo di fronte ad una specie che presenta attributi e variazioni morfologiche di una qualche complessità e tali da far apparire oggi troppo semplicistica la sua attribuzione al gen. *Candida*. Se la definizione della specie tipo che si fa per ogni

genere ha senso, non è difficile vedere che *Torulopsis* o *Candida pulcherrima* si discosta sensibilmente dalla specie tipo dell'uno e dell'altro genere.

La costante presenza e il prodursi spesso prevalente di clamidospore caratteristicamente contenenti grande massa oleosa; il possibile formarsi di cellule irregolari di aspetto ameboide; l'evoluzione delle cellule normali e delle clamidospore che possono anche non gemmare ma dare origine a tubi di aspetto miceliare e a pseudomicelio; la stessa organizzazione pseudomiceliare quando questo insorga come espressione di processi dissociativi; la discussa (anche se dai più negata) sporogenicità; sono tutti fatti che, nei riguardi dei formulati riferimenti sistematici, lasciano alquanto perplessi.

Anche nei riguardi della posizione sistematica di *Candida Reukaufii* — e alla quale sono da riferirsi i ceppi del gruppo *C* di questo lavoro — non sono mancate discussioni.

Descritta in un primo tempo come rappresentante di un dstinto genere denominato prima *Anthomyces* e, quindi, *Nectaromyces*, fu finalmente riferita, da DIDDENS e LODDER, al gen. *Candida* ([10]). Ma, anche per questa specie, valgono le considerazioni e le riserve sopra avanzate per *C. pulcherrima* e, d'altronde, già in precedenza formulate. L'unico fatto certo è che *C. Reukaufii* differisce sostanzialmente da *C. pulcherrima*, nonostante l'uguale abito fisiologico e la stessa fisionomia morfologica.

Una breve discussione esige ora il riferimento dei ceppi che abbiamo elencato nel gruppo *B*.

Anche questi presentano le stesse caratteristiche fisiologiche di *C. pulcherrima* e di *C. Reukaufii*. Presentano altresì la stessa fisionomia morfologica poichè, anche in tal caso, si hanno cellule normali, clamidospore e possibili forme pseudomiceliari.

A quale delle due ricordate specie sono eventualmente riferibili, ammesso possibile tale accostamento?

Sarà utile, forse, riassumere in prospetto, che riportiamo a pagina seguente, i fondamentali caratteri morfologici.

Un esame comparativo dei segnati caratteri informa che, per trovare qualche differenza, occorre far riferimento al solo abito delle cellule normali e delle clamidospore.

Nei riguardi delle cellule normali i ceppi del gruppo *B* sembrano sovrapporsi — per forma e dimensioni — a quelli propri di *C. pulcherrima*.

Nei riguardi delle clamidospore esse riprendono, come forma, quelle di *C. Reukaufii*. Si noti che *C. Reukaufii* domina nei nettari dai quali

	Cellule normali	Clamido-spore	Forme ameboidi	Forme pseudomic.
gruppo A	globose corto-ovali ovalari µ (3.5-5) x (5.2-8.4)	globose (raramente ovalari) µ 6-10-12	possibili	possibili
gruppo B	subglobose ovalari ovato-ellit. µ (2.6-5.2) x (5.2-8.4)	ovalari subellittiche (mai globose) µ (3.6-5.2) x (6.8-9.1)	possibili	possibili
gruppo C	cilindriche µ (2.4-3.2) x (7.8-12)	ovalari ellittiche µ(5.8-6.6-7.8)x x(14.4-15.6--18.2)	non osservate	possibili

provengono anche gli isolati del gruppo *B*. Se simile ne è la forma, non sovrapponibili ci appaiono però le dimensioni. E' vero che in *C. Reukaufii* queste sono relativamente variabili; ma tutti gli Aa. danno — a quanto ci consta — dimensioni maggiori di quelle presentate dagli isolati del gruppo *B*. Secondo NADSON e KRASSILNIKOV, ad es., esse misurano µ (7-8.5) x (10-14); secondo MARTIN ([28]) che fa di *C. Reukaufii* due distinti tipi (Gartyp e Fettbildungstyp) nell'idea che siano riferibili a clamidospore le cellule del secondo tipo, esse misurerebbero µ (8-9.6) x (11.8-13).

Tutto sommato, anche in considerazione del fatto che non abbiamo mai visto celulle dei ceppi del gruppo *B* disporsi a croce o ad « areoplano » come caratteristicamente avviene in *C. Reukaufii*, noi pensiamo dunque che tali ceppi siano piuttosto avvicinabili a *C. pulcherrima*, anche se da questa diversi per la diversità morfologica delle clamidospore. E pensiamo che ne potrebbero costituire, ad es., un tipo od una varietà.

Concludendo: sotto lo stesso abito fisiologico troviamo riuniti almeno due taxa diversi — *C. pulcherrima* e *C. Reukaufii* — tali essendo per i diversi caratteri morfometrici. Tra questi due taxa si inserisce

un tipo che pensiamo segregato da *C. pulcherrima* e che possiamo considerare come intermedio. Non riteniamo, peraltro, che esso possa costituire specie a sè, ma piuttosto una varietà di *C. pulcherrima.*

Questi due taxa sono al momento riferiti al gen. *Candida.* Ma noi ci domandiamo se, per le considerazioni avanzate, tale riferimento è da ritenersi esatto o non piuttosto si renda per loro necessaria la istituzione di un nuovo genere.

Riassunto. — *Gli Autori danno, in primo luogo, una descrizione relativamente particolareggiata circa quanto è noto intorno a* Candida pulcherrima. *Successivamente, e in comparazione con la stessa* C. pulcherrima, *viene riferito intorno allo studio di alcuni ceppi di lieviti isolati da eucalitto. Lo stesso studio comparativo è esteso anche a* Candida Reukaufii. *Si tratta di lieviti che rispondono tutti al medesimo stato fisiologico, ma che, peraltro, differiscono per l'aspetto morfometrico. Sono anche lieviti che presentano forme cellulari che possono ritenersi proprie e normali, clamidospore tipiche e che possono dare luogo, come espressione di fatti dissociativi, a formazioni pseudomiceliari.*

Con lo stesso abito fisiologico si presentano dunque riuniti due taxa diversi: Candida pulcherrima *e* C. Reukaufii, *diverse essendo queste specie per i loro caratteri morfometrici. Tra questi due taxa si inserisce un tipo, al quale fanno riferimento i ceppi isolati dagli Autori, e che è ritenuto segregato da* C. pulcherrima. *Questi due taxa sono riferibili al genere* Candida, *ma gli Autori si domandano se, in base ad alcune considerazioni che avanzano, tale riferimento è da ritenersi esatto, o non piuttosto si renda necessaria per gli stessi taxa la costituzione di un nuovo genere.*

Summary. — *The Authors start with a fairly detailed description of what is known about* Candida pulcherrima. *Several strains of yeasts isolated from Eucaliptus are then considered in comparison with* C. pulcherrima.

The same study is also extended to Candida Reukaufii. *These are all yeasts which are in the same physiological state, but differ morphometrically. They present normal cells and typical chlamydospores which can produce pseudomyceliai formations as an expression of dissociation. Two different taxa therefore present the same physiological state, along with morphometrical differences:* C. pulcherrima *and* C. Reukaufii.

Between these two taxa there is an intermediate type that is considered near to C. pulcherrima, *and, perhaps, separated from this species. These two taxa are generally attributed to Genus* Candida, *but the Authors consider, for several reasons, this attribution questionable and think it might be preferable to constitute a separate genus.*

BIBLIOGRAFIA

(1) Agostini A. (1950) - *Polimorfismo esogeno ed endogeno nei lieviti del gen. Brattanomyces.* L'Agr. Ital., *5*, 193.

(2) Beijerinck M. W. (1912) - *Mutation bei Mikroben.* Folia Mikrobiologica, *1*, 1.

(3) Beijerinck M. W. (1916) - *Vorming van eiwitten, koolhydraten en vetten door mikroben.* 25e Jaarv. Techn. Gez.te Delft, 104.

(4) Beijerinck M. W. (1918) - *Levûres chromogenes. Nouvelle réaction biologique du fer.* Arch. Neerl. de Phys., *2*, 609.

(5) Capriotti A. (1954) - *Indagini microbiologiche sulle carni insaccate: i lieviti.* Arch. Vet. Ital., *5*, 113.

(6) Capriotti A. (1955) - *I lieviti di alcuni terreni dell'Italia Centrale.* Riv. di Biologia, *47*, 209.

(7) Castelli T. (1940) - *Considerazioni sulla Torulopsis pulcherrima.* Arch. f. Mikr., *11*, 126.

(8) Castelli T. (1948) - *Gli agenti della fermentazione vinaria in diverse regioni italiane.* Riv. Vit. Enol., Conegliano, *1*, 8.

(9) de' Rossi G. (1935) - *I lieviti della fermentazione vinaria nella regione umbra.* Rel. al IV Congr. int. d. Vigna e d. vino, Losanna.

(10) Diddens H. A. e Lodder J. - *Die anaskosporogen Hefen.* Amsterdam, 1942.

(11) Domercq S. (1956) - *Etude et classification des levures de vin de la Gironde.* Tesi dell'Univ. di Bordeaux.

(12) Florenzano G. (1949) - *La microflora blastomicetica dei mosti e dei vini di alcune zone toscane* Ann. Sp. Agrar., *3*, 887.

(13) Florenzano G. (1953) - *Ulteriori ricerche sui lieviti del « governo » dei vini in Toscana.* Atti Acc. Ital. Vite e Vino, *4*, 529.

(14) Florenzano G. (1953) - *Effetto della tiamina sull'attività fermentativa di Candida pulcherrima.* Atti Congr. Int. Micr., Roma, 7, 63.

(15) Grosbüsch J. (1915) - *Ueber eine farblose, starkroten Farbstoff erzeugende Torula.* Centr. f. Bakt., II Abt., *42*, 625.

(16) Grüss J. (1917) - *Ueber die Anpassung eines Pilzes (Anthomyces Reukaufii) an den Blütenbau und den Bienenrüssel.* Ber. deut. Bot. Gesell., *35*, 746.

(17) Guilliermond A. e Tanner F. W. - *The Yeasts*, N. Y., 1920

(18) Kluyver A. J., van der Walt J. P. e van Triet A. J. (1953) - *Pulcherrimin the pigment of Candida pulcherrima.* Not. Ac. of Sc., *39*, 583.

(19) Krumbholz G. (1931) - *Untersuchungen über osmophile Sprosspilze.* Arch. f. Mikr., *2*, 411.

(20) LANGERON M. e LUTERAAN PH. J. (1947) - Ann. parasitol. humain et comparée, *22*, 254. (cit. da LODDER e KRAGER-VAN RIJ).
(21) LINDNER P. (1901) - *Mikroscopische Betriebskontrolle in den Gärungsgewerben;* 3a Ed., Berlino.
(22) LIDNER P. (1930) - ibidem, 6a Ed., Berlino.
(23) LINDNER P. e EULER H. (1915) - *Chemie der Hefe und der alkoholischen Gärung.* Leipzig.
(24) LODDER J. (1934) - *Die anaskosporogen Hefen.* K. Akad. Wet., Verhand.
(25) LODDER J. e KREGER-VAN RIJ N. J. W. (1952) - *The Yeasts: a taxonomic study.* Amsterdam.
(26) MAGNI G. E. (1953) - *Analisi della ploidia in alcuni generi di lieviti asporigeni.* Atti Ist. Bot. Univ. Pavia, *10*, 89.
(27) MALAN C. E. (1957) - *I lieviti predominanti nei mosti di alcuni vini tipici del Piemonte.* Ann. Acc. Agr. di Torino, *100*.
(28) MARTIN H. M. (1954) - *Beitrag zur kenntnis der Morphologie und Physiologie der Nektarhefe Candida Reukaufii (Grüss) Diddens et Lodder.* Arch. f. Mikr., *20*, 141.
(29) MELLIGER R. (1931) - *Contribution a l'étude des ferments figurés et des fermentations de la datte.* Tesi, Ginevra.
(30) MELAS-JOANNIDIS Z. e altri (1958) - *Ricerche microbiologiche sopra i mosti d'uva in fermentazione nel Peloponneso.* Ann. Microb., *8*, 118.
(31) MRAK E. M. e MC CLUNG L. S. (1940) - Journ. of Bact., *40*, 395.
(32) NADSON G. A. e KRASSILNIKOV N. A. (1927) - *La levure du nectar des fleurs: Anthomyces Reukaufii.* Bull. Soc. Mycol. Franc., *43*, 232.
(33) PORCHET B. (1938) - *Contribution à l'étude de la levure Torulopsis pulcherrima.* Ann. de Ferment., *4*, 385.
(34) PULSELLI M. (1927) - *Studio sui fermenti alcoolici dei mosti dell'Umbria.* Nuovi Ann. dell'Agric., 7.
(35) PUNKARI L. e HENRICI A. T. (1933) - *A study of variation in a chromogenic asporogenous yeast.* Journ. of Bact., *26*, 125.
(36) RAMBELLI A. (1960) - *Primo contributo alla conoscenza della microflora blastomicetica dei fiori di Eucalitto.* Pubbl. Centro Sper. Agr. For., *4*, 16.
(37) RIBEREAU-GAYON J. e PEYNAUD E. (1960) - *Traité d'Oenologie.* Paris.
(38) ROBERTS C. (1946) - *A comparative Study of Torulopsis pulcherrima and Taphrina deformans in culture.* Farlowia, *2*, 345.
(39) SACCARDO P. A. (1906) - *Sylloge Fungorum omnium hucusque cognitorum. 18*, 415.
(40) SACCHETTI M. (1933) - *Contributo alla conoscenza della flora microbica di alcuni formaggi italiani.* Arch. f. Mikr., *4*, 427.
(41) VAN DER WALT J. P .(1952) - *On the Yeast Candida pulcherrima and its pigment.* Diss. Delft.
(42) VAN DER WALT J. P. e VAN KERKEN A. E. (1960) - *The wine yeasts of the Cape: IV, Ascospore formation in the genus Brettanomyces.* Ant. v. Leeuw. *26*, 292.
(43) VERONA O. (1949) - *Qualche osservazione sulla fisiologia di Candida pulcherrima (Lindner) Windisch in rapporto alla fermentazione vinaria.* Ann. Fac. Agr. Univ. Pisa, *10*, 21.
(44) VERONA O. e FLORENZANO G. (1947) - *Sopra alcuni aspetti morfologici di Candida pulcherrima (Lindner) Wind.* Ann. Fac. Agr. Univ. Pisa, *8*, 103.

(45) VERONA O. e LUCHETTI G. (1936) - *Ricerche microbiologiche su di alcuni vini ed alcune uve delle Marche.* Boll. Ist. Sup. Agr., *12*, 256.

(46) VERONA O. e PICCI G. (in stampa) - *Sur le pouvoir N-fixateur de Candida pulcherrima.* Ann. Inst. Pasteur

(47) VERONA O. e RAMBELLI A. (in stampa) - *Intorno ad un ceppo di Candida Reukaufii (Grüss) Diddens et Lodder isolato da fiori di Eucalitto.* Atti Ist. Bot. Univ. Pavia.

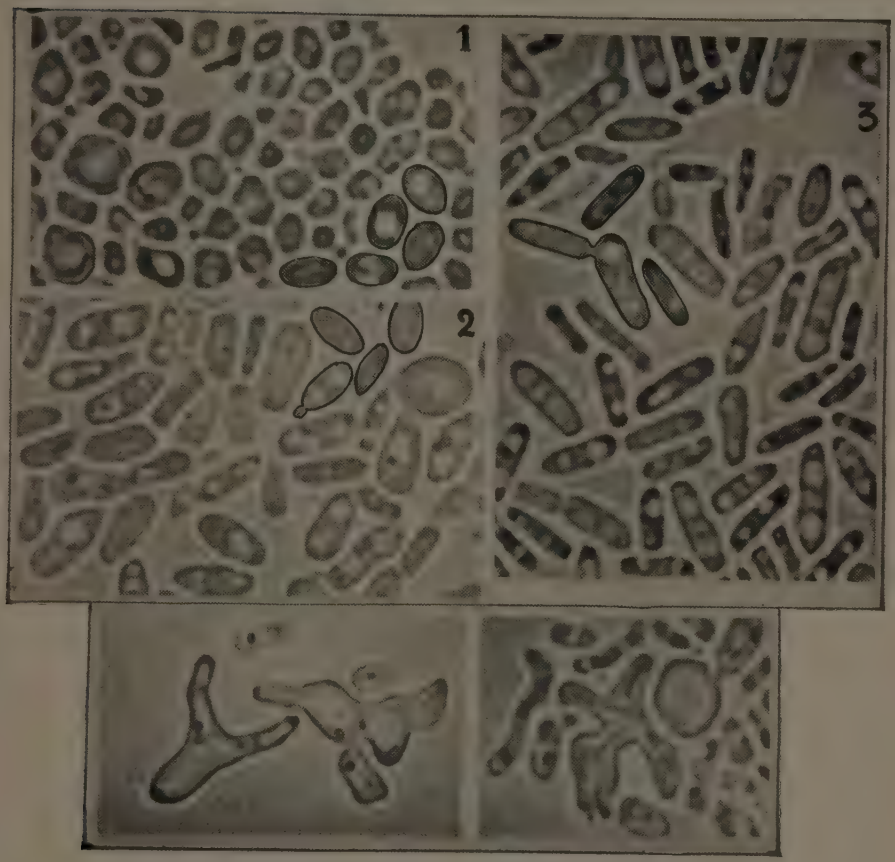
(48) VERONA O. e RAMBELLI A. (in stampa) - *About two isolates labelled Taphrina farlowii Sad. and Taphrina californica Mix.* Phytop. Zaischr.

(49) VERONA O. e ZARDETTO DE TOLEDO O. (1954) - *Indagini speciologiche sopra alcuni lieviti isolati dai fiori di vite nel territorio di S. Paolo in Brasile.* Ann. Fac. Agr. Univ. Pisa, *15*.

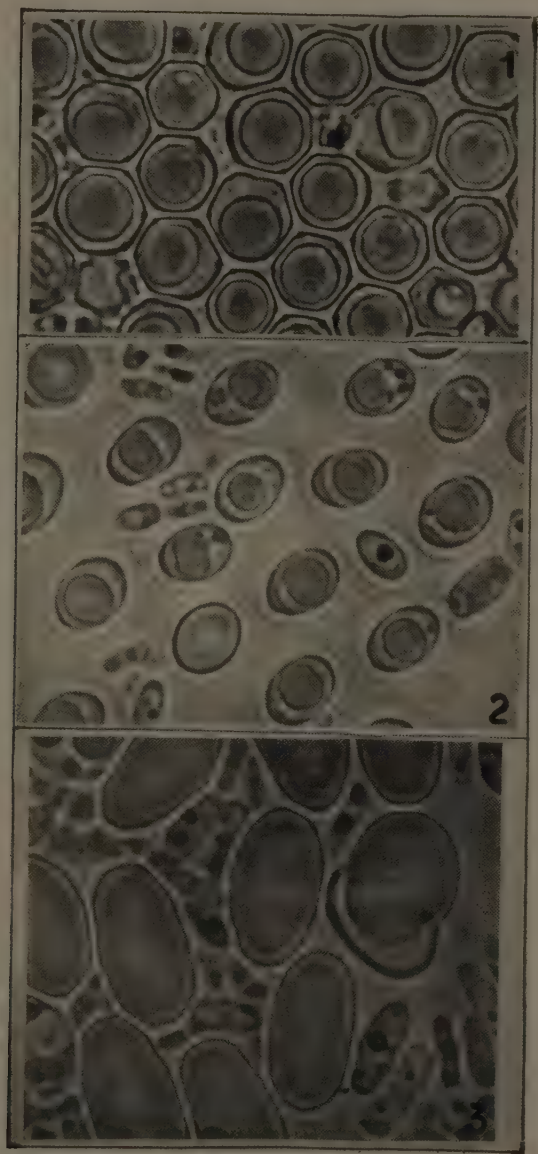
(50) WINDISCH S. (1938) - *Zur Kenntnis der Askosporenbildung bei Torulopsis pulcherrima (Lindner) Sacc.* Arch. f. Mikr., *9*, 551.

(51) WINDISCH S. (1940) - *Entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen an Torulopsis pulcherrima (Lindner) Sacc. und Candida tropicalis (Cast.) Berkhout.* Arc. f. Mikr., *11*, 368.

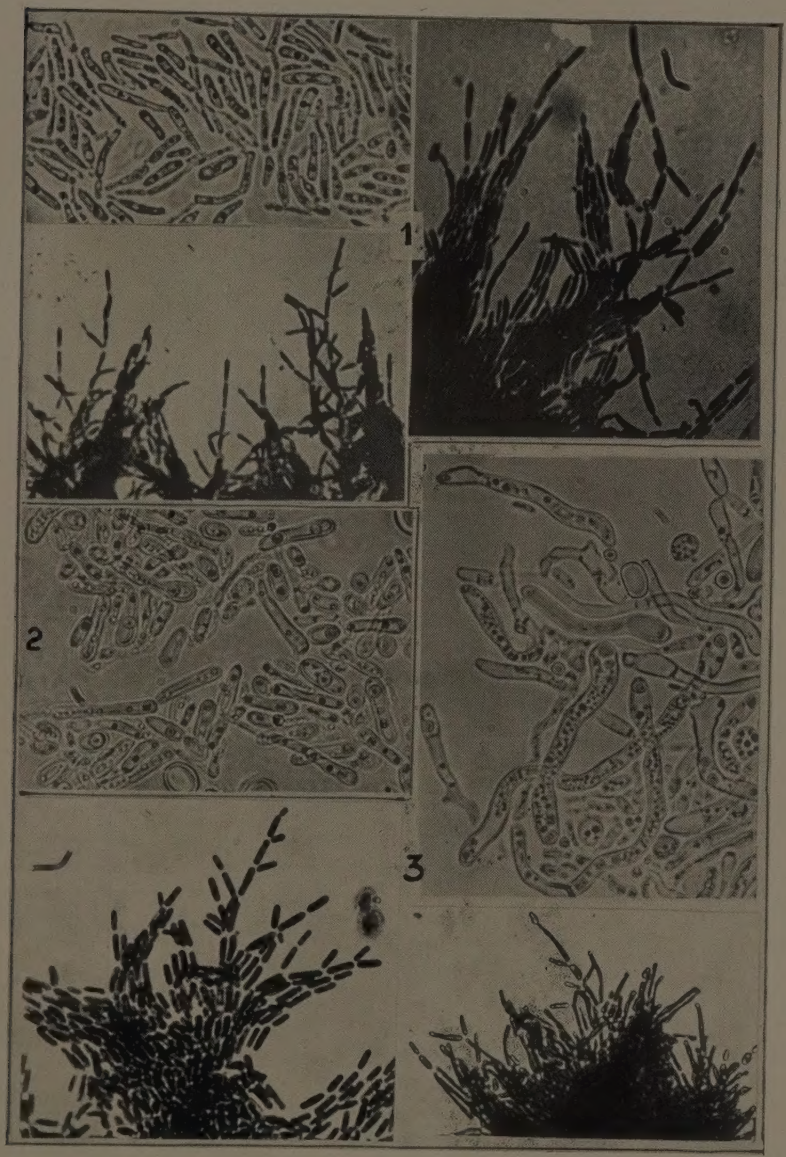
TAV. I - Quadro d'insieme di *C. pulcherrima* (1), dei ceppi del gruppo *B* (2) e di *C. Reukanfii* (3). Ingr. x 810.



TAV. II - Cellule normali di *C. pulcherrima* (1), dei ceppi del gruppo *B* (2) e di *C. Reukaufii* (3). In basso cellule ameboidi. Ingr. x 1.700.



TAV. III - Clamidospore di *C. pulcherrima* (1), dei ceppi del gruppo *B* (2) e di *C. Reukaufii* (3). Ingr. x 1.700.



TAV. IV - Formazioni pseudomiceliari in *C. pulcherrima* (1), nei ceppi del gruppo *B* (2) *e in C. Reukaufii* (3).